

**ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ACONITUM BARBATUM PATR. EX PERS. КАК
ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**М.В. Филонова^{1,2}, Е.С. Филоненко¹

Научный руководитель: д.м.н А.А. Чурин, д.х.н Л.Н. Зибарева

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, Томск пр. Ленина, 36, 634050

²Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга,

Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск,

Россия, Томск пр. Ленина, 3, 634028

E-mail: Maria-Caurus7@yandex.ru**CALLUS CULTURE PRODUCTION OF ACONITUM BARBATUM PATR. EX PERS. AS A SOURCE
OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**M. V. Filonova^{1,2}, E.S. Filonenko¹

Scientific supervisor: Prof., Dr. A. A. Churin, Prof., PhD L. N. Zibareva

¹National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Prospekt 36, corp. 1, 634050.²Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical

Center, Russian Academy of Sciences, Russia, Tomsk, Lenin Prospekt 3, 634028

e-mail: Maria-Caurus7@yandex.ru

Abstract. *Aconitum barbatum* Patr. ex Pers. is perennial plant from the Ranunculaceae Juss. family. It is well known and used in traditional Chinese, Tibetan and Mongolian medicine for the treatment of many diseases. *Aconitum barbatum* is a rare species. The callus culture was obtained from *Aconitum barbatum* Patr. ex Pers. which is a very rich source of biologically active substances. The optimal conditions for cultivation and chemical analysis were selected for this culture. Chemical analysis showed the presence of phenolic compounds in callus culture of *Aconitum barbatum*.

Введение. Борец бородатый (*Aconitum barbatum* Patr. ex Pers.) - многолетнее растение семейства Лютиковые (*Ranunculaceae* Juss). Этот вид используется в традиционной китайской, тибетской и монгольской медицине для лечения заболеваний ревматического происхождения, невралгиях и простуде [1], обладает болеутоляющим [2] и противоопухолевыми свойствами [3]. *A. barbatum* хорошо известен, но является редким видом, имеет невысокую численность и ограниченное распространение в Томской области [1].

Спектр фармакологической активности борца бородатого обусловлен содержанием различных групп биологически активных веществ (БАВ). Борец содержит дитерпеновые алкалоиды, такие как – делькозин, ликоктонин, зонгорин, батаконин [4], кордин [2], флавоноиды, в частности барбазид [5]. Получение необходимого количества растительного сырья для выделения БАВ затруднено из-за невысокой численности популяции растений. Введение в культуру борца представляет интерес, так как позволит получить достаточную биомассу в контролируемых условиях, что является явным преимуществом такого способа для получения биологически активных веществ по сравнению с

получением ее из природного сырья. Получение культуры *in vitro* алкалоидоносных растений затруднено, предположительно, из-за выделения ядовитых соединений в питательную среду, которые могут снижать жизнеспособность клеток [6].

Цель настоящего исследования - получить культуру клеток борца бородатого и оценить способность культивируемых клеток к синтезу вторичных метаболитов.

Материалы и методы исследования. Получение каллусной культуры *Aconitum barbatum*. Семена стерилизовали, стратифицировали в холодильнике в течение 2,5 месяцев, далее повторно стерилизовали и проращивали в пробирках с агаризованной питательной средой Мурасиге-Скуга (MS), без добавления гормонов. Стерилизацию каждый раз осуществляли последовательно в 70 % спирте и 0,1 % сулеме, после чего отмывали семена в дистиллированной воде. Каллусную ткань получали из этиолированных проростков, которые разделяли на экспланты и помещали на питательную среду с MS добавлением гормонов 2-4 D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) и 6-БАП (6-бензиламинопурин). Дальнейшее культивирование осуществляли на среде MS добавлением гормонов α -НУК (α -нафтилуксусная кислота) и 6-БАП, с пересадкой на свежую среду каждые 20 дней.

Методы исследования БАВ. Анализ содержания БАВ осуществляли в лаборатории фитохимии Сибирского ботанического сада ТГУ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). 1-2 г сырья трехкратно экстрагировали 70 % раствором этанола на водяной бане при 55 °С в течение 12 часов с последующим концентрированием с помощью ротационного испарителя «IKA HB 10 digital» (Германия). ВЭЖХ/УФ анализ выполнен на жидкостном хроматографе «Shimadzu LC-20 AD» (Япония) с диодноматричным детектором. Хроматографическая колонка Perfect Sil Target ODS-3; 4,6 x 250 мм, размер зерна сорбента – 5 μ m, t = 40 °С, элюирование смесью ацетонитрила и изопропилового спирта (5:2) и 0.1 % трифторуксусной кислоты в градиенте от 15 до 35 %, в течение 40 мин. Скорость элюирования – 1 мл/мин. Объем инъекции 5 мкл. Аналитическая длина волны λ_{\max} = 272 нм для регистрации флавоноидов, время анализа 60 мин.

Результаты. На кафедре физиологии растений и биотехнологии НИ ТГУ была получена каллусная культура *Aconitum barbatum* Patr. Ex Pers из этиолированных проростков, подобрана питательная среда для получения и культивирования.

В экстрактах дикорастущего и культуры ткани борца бородатого обнаружено большое количество соединения фенольной природы, некоторые данные представлены в таблице (Таблица 1).

Таблица 1

Идентификация БАВ в нативном и экстракте культуры ткани *Aconitum barbatum*

Растительный экстракт		Соединения	Экстракт культуры ткани	
Время удерживания, мин	Макс. длина волны, нм		Время удерживания, мин	Макс. длина волны, нм
5.156	276	салидрозид		
10.371	281, 314		10.513	282
11.207	289, 313		11.481	278
14.317	256, 354		14.065	281
16.536	266, 346		16.625	289
18.233	265, 347		18.001	289
19.232	256, 339	рутин	19.462	289
21.087	266, 315		21.049	287
21.759	268		21.564	286
22.506	265, 343		22.374	289

23.434	265, 341		23.586	286
24.502	254, 328		24.522	286
25.152	267		25.120	286
27.415	268, 318		27.136	282
28.454	268, 321	хризин-7-О-глюкозид	28.536	282
29.052	256, 318		29.379	285
30.189	265, 323		30.010	281
32.558	268		32.561	285
33.807	266, 322		33.720	281
35.463	283, 309		35.583	280
38.075	316, 269		38.190	281

Сравнение хроматографических и спектральных характеристик выявленных соединений и стандартов показало, что в экстракте дикорастущих растений идентифицированы флавоноиды рутин, хризин-7-О-глюкозид и гликозид п-тирозола - салидрозид. В экстракте культуры ткани *Aconitum barbatum* обнаружен ряд простых фенольных соединений. Наличие $\lambda_{\max} = 278-289$ нм в экстракте культуры ткани указывает на синтез фенольных соединений, в структурах которых присутствует одно бензольное кольцо, тогда как для флавоноидов характерно наличие двух максимумов поглощения, соответствующие двум бензольным кольцам. В процессе синтеза флавоноидов объединяются ацетатный и шикиматный пути, в результате которых образуются фенольные соединения с двумя ароматическими кольцами.

Закключение. В результате проведенной работы была получена каллусная культура борца, подобрана питательная среда для ее культивирования. Выявлено, что дикорастущий вид *Aconitum barbatum* богат соединениями полифенольного комплекса, в том числе флавоноидами. Однако в процессе культивирования каллусной культуры борца биосинтез фенольных соединений ограничивается большей частью стадией образования фенолов с одним ароматическим кольцом. Возможно, один из биосинтетических путей, видимо, ацетатный не запускается в условиях *in vitro*, поэтому синтезируются простые полифенолы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Некратова А.Н. Редкие лекарственные растений Томской области и их выращивание // Вестник КрасГАУ. - 2014. - № 5. - С. 88-90.
2. Sun, Li-Mei, Nan, Ze-Dong, Huang, Hong-Li, Li, Wen-Hai, Yuan, Cheng-Shan (2009). Chemical constituents of *Aconitum barbatum* var. *puberulum*. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 45, no. 6, pp. 934.
3. Wada, K., Ohkoshi, E., Zhao, Y., Goto, M., Morris-Natschke, S.L., Lee, K.H. (2015). Evaluation of *Aconitum* diterpenoid alkaloids as antiproliferative agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 25, no. 7. pp. 1525-1531.
4. Batbayar, N., Batsuren, D., Sultankhodzhaev, M. N., Yunusov, M. S. (1988). Alkaloids of *Aconitum barbatum*. Structure of bataconine. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 24, no. 2, pp. 200-202.
5. Pogodaeva, N. N., Fedorov, S. V., Kanitskaya, L. V., Semenov, A. A. (2000). New flavonoid oligoside from *Aconitum barbatum*. Russian Chemical Bulletin, Vol. 49, no. 11, pp. 1905-1909.
6. Мигранова И.Г. Анализ каллусной ткани *Aconitum septentrionale* Koelle: Физиологические и генетические аспекты: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Уфа, 2000. – 102 с.